

LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN ALIMENTI PRONTI PER IL CONSUMO

RISK ASSESSMENT OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN READY-TO-EAT FOODS

ROBERTA NUVOLONI, FRANCESCA PEDONESE,
CARLO D'ASCENZI, SALVO RINDI

RIASSUNTO

La valutazione quantitativa del rischio costituisce un metodo che consente di esaminare, in modo sistematico, le informazioni ed i dati scientifici disponibili per arrivare a valutare la probabilità con cui un dato pericolo si può manifestare. Quest'ultimo può essere costituito da un'infezione, una patologia grave o addirittura dalla morte di una persona, conseguente al consumo di alimenti inquinati da patogeni alimentari. Un rischio può essere valutato in termini assoluti, per esempio prendendo in considerazione il numero dei consumatori che si ammalano ogni anno a causa del consumo di certi prodotti, o in termini relativi, paragonando la sicurezza di un prodotto in rapporto a quella di un altro. Nel presente lavoro viene riportata una sintesi del documento stilato nel 2003 da FDA e USDA (*U.S. Food and Drug Administration/Usda Food Safety and Inspection Agency*) sulla valutazione quantitativa del rischio da *Listeria monocytogenes* in diversi tipi di prodotti alimentari pronti per il consumo (*ready-to-eat foods*), effettuato allo scopo di definire la probabilità di infezione umana associata alla loro assunzione. Poiché FDA e USDA si sono posti come finalità la valutazione del rischio di infezione per il consumatore, hanno utilizzato dati e informazioni relativi solo alle fasi più prossime a quella del consumo. Nell'illustrare le quattro fasi che costituiscono il classico percorso della valutazione del rischio (identificazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio), verranno riportati anche i dati relativi a *L. monocytogenes* ed alimenti pronti per il consumo ricavati dalla letteratura più recente.

Parole chiave: *Listeria monocytogenes*, alimenti pronti per il consumo, valutazione del rischio

SUMMARY

Quantitative risk assessment is a scientific approach, able to link data from food and various data on human diseases, to provide a clear estimation of the severity of hazards and the likelihood that they will occur. The hazards can be constituted from an infection, a severe disease or even the death, consequent to the contaminated food consumption. A risk can be evaluated in absolute

terms, for instance taking into consideration the number of listeriosis cases per year because of the consumption of these products, or comparing the risk of a product in relationship to that of another one. Foodborne listeriosis is a relatively rare but serious disease with high fatality rates (20-30%) compared with other foodborne microbial pathogens. In this study an overview of quantitative risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, carried out in 2003 by U.S. Food and Drug Administration and Usda Food Safety and Inspection Agency, is reported. This research is limited to foods at retail and their subsequent public health impact at the time of consumption. The four steps of risk assessment (hazard identification, hazard characterization, exposure assessment and risk characterization) are described. Moreover a brief survey of the most recent literature about *L. monocytogenes* and ready-to-eat foods is reported.

Key words: *Listeria monocytogenes*, ready-to-eat foods, risk assessment

INTRODUZIONE

L'analisi del rischio come tecnica di valutazione, gestione e comunicazione del rischio era già conosciuta agli inizi degli anni '70, ma solo di recente ha ricevuto un'attenzione particolare come applicazione specifica nel campo della microbiologia degli alimenti e, più in generale, della sicurezza alimentare. Nei primi tempi, le linee-guida e le raccomandazioni relative all'applicazione dell'analisi del rischio elaborate da organismi internazionali, impegnati nel campo della sicurezza alimentare, erano puntate su un approccio di tipo generale e multidisciplinare. Con il passare degli anni e l'accumularsi delle prime esperienze pratiche, queste linee di comportamento hanno acquisito un taglio sempre più specifico-settoriale relativamente ai diversi campi di applicazione. A partire dal 1999 FAO e OMS hanno finanziato e condotto studi di valutazione del rischio applicati a diverse combinazioni patogeni-alimenti, sia per affrontare particolari problematiche di gestione dei rischi e migliorare la relativa metodologia, sia per formulare opportune linee-guida da applicare alle diverse fasi che costituiscono la valutazione quantitativa del rischio.

In ambito europeo, le istituzioni comunitarie hanno già da tempo introdotto nella normativa sulla sicurezza alimentare i concetti di *risk analysis* e *risk assessment*. Il Regolamento (CE) n. 178 del 28 gennaio 2002, che stabilisce e fissa i requisiti generali della legislazione alimentare, comprese le procedure nel campo della sicurezza alimentare e le responsabilità degli Stati membri, individua nell'Analisi del Rischio il modello operativo di riferimento ed istituisce l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare con il compito di fornire alla Commissione la necessaria assistenza scientifica e tecnica per l'individuazione e la valutazione dei "rischi emergenti" associati agli alimenti (Ferri & Giaccone, 2003). L'entrata in vigore dal 1 gennaio 2006 del cosiddetto "pacchetto igiene", un gruppo di regolamenti comunitari che rinnovano completamente la normativa riguardante la sicurezza alimentare (Reg. (CE) 852/04, 853/04, 854/04, 882/04), ha completato il riassetto del sistema europeo. Nel contesto di questa "rivoluzione culturale" si inseriscono anche i nuovi metodi preposti a giudicare l'innocuità per il consumo di alimenti contenenti microrganismi

o residui chimici potenzialmente pericolosi. Infatti non ci si porrà più l'esigenza stringente di produrre alimenti del tutto privi di batteri o di residui, quanto piuttosto di valutare la probabilità che la loro presenza possa causare un danno reale alla salute del consumatore. La metodologia che permetterà di effettuare questi calcoli probabilistici è proprio quella della valutazione del rischio. Sui risultati ottenuti con tale metodologia saranno improntati tutti gli approcci di normativa e igiene adottati in futuro nell'Unione Europea. La valutazione del rischio, grazie ad un approccio strutturato, permette di stimare il rischio e prendere coscienza dei fattori che lo influenzano in modo positivo o negativo. Un rischio può essere valutato in termini assoluti, per esempio prendendo in considerazione il numero dei consumatori che si ammalano ogni anno a causa del consumo di certi prodotti, o in termini relativi, per esempio paragonando la sicurezza di un prodotto in rapporto a quella di un altro.

Il presente lavoro analizza le metodologie ed i risultati delle valutazioni del rischio relativo a *Listeria monocytogenes* in alimenti pronti per essere consumati (*ready-to-eat foods* o RTE).

IDENTIFICAZIONE DEL PERICOLO

L. monocytogenes è un germe bastoncellare, Gram positivo, mobile a temperature comprese tra 20° e 30°C, asporigeno ed anaerobio facoltativo. Se ne riconoscono 13 sierotipi, caratterizzati dalla presenza di 15 antigeni somatici e 4 antigeni flagellari. Tutti i ceppi sono patogeni, ma la virulenza relativa a ciascun ceppo può variare considerevolmente, fino ad essere 1000 volte maggiore in alcuni (Hof & Rocourt, 1992). La maggior parte dei casi di listeriosi è associata ad un ristretto numero di sierotipi: 1/2a (15-25%), 1/2b (10-35%), 1/2c (0-4%), 3 (1-2%), 4b (37-64%) e 4 non b (0-6%) (Mc Lauchlin, 1990; Farber & Peterkin, 1991).

Le forme cliniche di listeriosi possono essere distinte in due categorie: invasiva e non invasiva. Quest'ultima, riportabile ad una gastroenterite febbrile, è caratterizzata da sintomi gastroenterici con diarrea, febbre, cefalea e mialgia, dopo un breve periodo di incubazione. Nella listeriosi invasiva invece il periodo di incubazione può essere molto lungo: normalmente va da 2 a 3 settimane, ma occasionalmente arriva fino a 3 mesi. In questa forma di malattia, *L. monocytogenes* penetra nella mucosa intestinale e, dopo una prima fase di adesione e moltiplicazione a questo livello, si diffonde per via ematogena al fegato, all'utero gravido ed al sistema nervoso centrale. È possibile anche che tale microrganismo penetri nell'organismo attraverso piccole ferite presenti nel cavo orale, in faringe o in esofago; più rara è la penetrazione dell'infezione tramite la via respiratoria. (Hof, 2003). Nella donna in gravidanza si può avere aborto, nascita prematura o malattia neonatale del bambino. Le principali forme invasive di listeriosi sono tre: 1) Meningoencefalite: a rapida evoluzione e mortalità elevata; 2) Granulomatosi settica o tifoso-pneumonica: con focolai di tipo miliare a fegato, milza e polmoni e mortalità compresa tra il 30 e il 50%; 3) *Granulomatosis infantiseptica* o listeriosi neonatale: per lo più conseguente a infezione transplacentare, caratterizzata da formazioni granulomatose nei visceri, dette listeriommi, da lesioni esantematiche e da morte poco prima o poco dopo la nascita. Sono state segnalate anche altre

forme meno comuni: oculoghiandolare, caratterizzata da congiuntivite purulenta ed interessamento dei linfonodi regionali; cervicoghiandolare, con interessamento dei linfonodi cervicali; anginoso-settica, con fenomeni di angina a decorso benigno; esantematica, con eritema di tipo papuloso (Doganay, 2003).

La listeriosi di origine alimentare è una malattia piuttosto rara ma grave, con un tasso di mortalità (20-30%) paragonabile a quello di altre malattie alimentari, quali ad esempio la salmonellosi. In relazione alla sua incidenza e alla sua gravità, l'impatto economico e sociale della listeriosi è considerato tra i più alti fra le malattie di origine alimentare.

L'incidenza annuale della listeriosi è compresa in un range da 0,1 a 11,3 casi per milione di persone; in particolare è di 0,3-7,5 casi per milione in Europa, 4,4 casi per milione negli Stati Uniti e 3 casi per milione in Australia (Notermans et al., 1998; Mead et al., 1999). Tali dati devono essere valutati tenendo conto di numerosi fattori, primo dei quali è sicuramente la differente qualità ed efficacia dei piani nazionali di sorveglianza nei diversi Paesi. La gravità della listeriosi fa sì che le persone colpite abbiano bisogno di cure mediche e negli Stati Uniti il *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) ha stimato che il 90% dei casi di listeriosi venga ospedalizzato e che circa la metà sia segnalata al CDC. La listeriosi è stata evidenziata soprattutto nei Paesi industrializzati, ma non è noto se le differenze nei tassi di incidenza dei Paesi industrializzati e di quelli in via di sviluppo, siano il riflesso di differenze geografiche e di abitudini alimentari oppure delle diverse situazioni relative alla diagnosi ed alle pratiche di segnalazione.

Listeria monocytogenes è stata spesso isolata dagli animali, sia domestici (pecore, bovini, polli), che selvatici. Ne è stata più volte segnalata la diffusione nei volatili, peraltro poco sensibili all'infezione e, secondo alcuni Autori, anche i ratti rappresenterebbero un importante serbatoio di tale patogeno (Ivanek et al., 2006). È stato inoltre ipotizzato il ruolo di vettori d'infezione rivestito da alcuni artropodi (zecche e tabanidi) (Bauda & Monfort, 2004). Nell'uomo è stato stimato che una parte della popolazione, dal 2 al 10%, sarebbe portatore sano di listeria a livello intestinale (Skidmore, 1981). Si tratta di un germe ubiquitario, rilevato spesso a livello di acqua, alimenti vegetali e terreno. Negli animali da reddito una delle principali fonti di infezione sarebbe rappresentata dall'insilato, nel quale *L. monocytogenes* può essere riscontrata in concentrazioni elevate, in particolare a livello degli strati superficiali e marginali, specialmente durante la stagione invernale, a causa di un'insufficiente acidificazione ($\text{pH} > 4,5$).

L. monocytogenes può svilupparsi alle temperature di refrigerazione ed è molto resistente agli agenti fisico-chimici e nell'ambiente, dove può permanere a lungo (Ryser & Marth, 1991). È stata isolata da molti alimenti di origine animale, (latte, formaggi, gelati, carne, prodotti carnei, prodotti della pesca) ed anche dagli ambienti di lavorazione (Buchanan et al., 1989; Farber & Peterkin, 1991; Ryser & Marth, 1999). Nei prodotti cotti la contaminazione può avvenire dopo il trattamento termico o essere la conseguenza di un insufficiente processo risanante.

In un'indagine condotta negli USA su diversi alimenti prelevati dai frigoriferi di persone affette da listeriosi, è stato riscontrato che gli stessi ceppi di *L. monocytogenes* isolati dagli alimenti, indistinguibili da quelli provenienti dai pazienti stessi, sono

stati rinvenuti anche nel 33% dei frigoriferi esaminati (Pinner et al., 1992). Poiché la frequenza con la quale le persone sono esposte a *L. monocytogenes* appare molto più alta rispetto all'incidenza reale della malattia, viene da tempo discusso il significato dell'ingestione con gli alimenti di cariche basse del microrganismo, specialmente da parte di consumatori non immunologicamente compromessi (Farber et al., 1996). Il livello di listeriosi negli Stati Uniti è attualmente stimato in circa 3 casi ogni milione di persone l'anno (CDC, 2006).

CARATTERIZZAZIONE DEL PERICOLO

L. monocytogenes è un patogeno opportunisto che colpisce più frequentemente alcune categorie di persone: pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva, affetti da AIDS o da malattie croniche come la cirrosi, che compromettono il sistema immunitario; donne in gravidanza, neonati ed anziani.

La listeriosi di tipo invasivo, come già accennato precedentemente, è caratterizzata da un'iniziale infezione del tessuto intestinale e da una successiva diffusione ad altri organi, come utero gravido, sistema nervoso centrale e sangue. Oltre a presentare un alto tasso di mortalità, può essere causa di *sequelae* sintomatologiche, la cui incidenza è difficilmente quantificabile (Rocourt, 1996).

Dal punto di vista epidemiologico, la listeriosi di tipo invasivo è caratterizzata da una relativa frequenza di casi sporadici e dall'occasionale segnalazione di focolai veri e propri. Secondo alcuni Autori il 95% di questi casi sporadici sarebbe di origine alimentare (Mead et al., 1999). La maggior parte di essi è stato descritto a partire dagli anni '80 ed ha coinvolto un numero piuttosto alto di persone, 122 in Svizzera negli anni dal 1985 al 1989, 300 in Gran Bretagna tra il 1987 ed il 1989 e 279 in Francia nel 1992 (Broome et al., 1990; Bille, 1990; Rocourt & Cossart, 1997).

La listeriosi di tipo non invasivo è stata invece osservata in occasione di alcuni focolai epidemici, nei quali la maggior parte delle persone colpite mostravano sintomi di gastroenterite dopo un breve periodo di incubazione (Dalton et al., 1997; Aureli et al., 2000). In questi focolai la malattia si è manifestata in seguito all'ingestione, da parte di persone in buone condizioni di salute, di alimenti contenenti alte cariche di *L. monocytogenes*.

Poiché i tassi di incidenza ed i fattori che governano l'insorgenza della forma non invasiva, sono attualmente ancora sconosciuti, nello studio di valutazione quantitativa del rischio (VQR) per *L. monocytogenes* in diversi tipi di prodotti alimentari pronti per il consumo, realizzato nel 2003 da FDA e USDA (*U.S. Food and Drug Administration/Usda Food Safety and Inspection Agency*), viene presa in considerazione solo la forma invasiva di listeriosi. Gli alimenti che risultavano coinvolti in occasione dei focolai epidemici, erano diversi: formaggio tipo *queso fresco*, formaggi morbidi a crosta lavata e fiorita, hot-dogs, lingua di maiale in gelatina, prodotti carni, patè, salame, latte al cioccolato, latte pastorizzato e non pastorizzato, burro, gamberetti bolliti, cozze e pesce affumicati, insalata di patate, verdure crude e insalata di cavoli.

Nei casi sporadici di listeriosi, all'origine della malattia era segnalato il consumo di: latte crudo, gelato non pastorizzato, ricotta, formaggi di capra e pecora, formaggi

morbidi a crosta lavata e fiorita, *queso fresco*, salame, hot-dogs, funghi trifolati, uova di merluzzo affumicate, cozze affumicate, pesce crudo, olive sotto aceto, verdure crude ed insalata di cavoli. In genere *L. monocytogenes* era presente con valori $> 10^3$ ufc/g, ma talvolta veniva riscontrata anche a valori più bassi.

Dal 1991 al 2002 sono stati segnalati in Europa 18 focolai di listeriosi invasiva, 3 di gastroenterite da listeria ed 1 misto delle due forme. Gli alimenti coinvolti erano: prodotti a base di carne, formaggi, prodotti ittici, burro, insalata di riso, mais, dolce alle crema (De Valk et al., 2005).

Per quanto riguarda la relazione dose-risposta, poiché non sono disponibili dati derivati da studi su volontari infettati con *L. monocytogenes* o con patogeni sostitutivi, la relazione dose-risposta deve essere sviluppata sulla base del parere di esperti, di dati epidemiologici nell'uomo o di dati ricavati da studi su animali o di una combinazione di questi. Tutti questi modelli di stima si basano sul presupposto che ciascuna cellula microbica agisca indipendentemente e sia una potenziale causa di malattia. Nella VQR di FDA/USDA (2003) viene utilizzato quanto emerge da uno studio effettuato negli Stati Uniti (FDA/FSIS, 2001). In questo modello si prevede un parametro "r", che rappresenta la probabilità che una singola cellula provochi listeriosi di tipo invasivo, stimato accoppiando i dati sul consumo (esposizione) con quelli epidemiologici, relativi al numero di casi di listeriosi invasiva nella popolazione. Il valore r così stimato è stato utilizzato in un modello statistico esponenziale per stimare i rischi specifici legati al numero di listerie ingerite con l'alimento. Più recentemente sono stati utilizzati da altri Autori i dati derivanti da uno studio effettuato sul topo, con le dovute correzioni legate al fatto che questa specie è molto più sensibile dell'uomo all'infezione da *L.monocytogenes* (CDC, 2006).

STIMA DELL'ESPOSIZIONE

Come è ormai ampiamente riconosciuto in tutto il mondo, la principale forma di listeriosi nell'uomo è dovuta al consumo di prodotti alimentari contaminati. Gli alimenti più spesso associati con la malattia sono quelli di tipo industriale, pronti per il consumo, i cosiddetti *ready-to-eat foods* (RTE), che presentano le seguenti caratteristiche: 1) sono un ottimo substrato per lo sviluppo di *L. monocytogenes*; 2) hanno una lunga *shelf-life* a temperature di refrigerazione; 3) vengono consumati tal quali, senza subire alcun trattamento risanante (ad esempio la cottura) (Pinner et al., 1992; Rocourt, 1996).

La stima dell'esposizione al rischio *L. monocytogenes* viene effettuata focalizzando l'attenzione sulle variazioni della frequenza e del grado di contaminazione degli alimenti, dal momento della vendita a quello del consumo. Prevede la descrizione della curva di crescita di *L. monocytogenes*, dal momento dell'acquisto a quello del consumo, usando le informazioni ed i modelli predittivi sul tempo di duplicazione ed il tempo di "lag fase" sulla base delle caratteristiche dell'alimento e delle condizioni ambientali di conservazione. Il calcolo del numero di listerie ingerite con l'alimento richiede anche i dati relativi alle quantità ed alla frequenza di consumo dell'alimento (grandezza e numero di porzioni).

Gli alimenti RTE sono costituiti da una vasta e variegata categoria di prodotti, preparati e conservati in modo ed in condizioni differenti, alcune adatte allo sviluppo di *L. monocytogenes* ed altre no. Poiché è impossibile prendere in considerazione tutti gli alimenti RTE, nella VQR di FDA/USDA (2003) ne vengono selezionati quattro (latte pastorizzato, gelato, prodotti fermentati a base di carne e pesce affumicato a freddo), che mostrano come le diverse caratteristiche del prodotto alimentare possono influenzare il rischio di contrarre listeriosi.

Il latte pastorizzato, un alimento diffuso in tutto il mondo, presenta una frequenza ed un livello di contaminazione basso, ma è un substrato adatto allo sviluppo di *L. monocytogenes* durante la conservazione, al contrario del gelato, che invece non ne permette lo sviluppo, essendo mantenuto a temperature più basse. I prodotti carnei fermentati risultano spesso contaminati da *L. monocytogenes* e vengono prodotti senza l'utilizzo di trattamenti risananti, ma non sono adatti allo sviluppo durante la conservazione. Il pesce affumicato a freddo è anch'esso frequentemente contaminato e, oltre a non subire trattamenti risananti durante la lavorazione, viene conservato in condizioni favorevoli allo sviluppo di listeria.

Per quanto riguarda la contaminazione al momento della vendita, vengono presi in considerazione i dati presenti in letteratura, spesso costituiti da determinazioni su presenza/assenza di *L. monocytogenes*, in base ad una sensibilità analitica di 0,04 *L. monocytogenes*/grammo (1 microrganismo in 25 grammi). Tali dati vengono elaborati immettendoli in vari tipi di distribuzione, utilizzate per la stima dei livelli di *L. monocytogenes*.

In uno studio condotto su 939 frigoriferi domestici negli Stati Uniti, è stato valutato l'impatto della temperatura domestica di conservazione sul numero di listerie al momento del consumo. Dai risultati emerge che l'1,4% degli apparecchi lavora ad una temperatura superiore ai 10°C, alla quale *L. monocytogenes* duplica rapidamente (Nauta, 2001).

Non essendo disponibili informazioni sui tempi di conservazione alla vendita ed in casa, gli Autori della VQR di FDA/USDA (2003), dopo una consultazione con vari esperti, hanno stabilito dei tempi (minimo, più frequente e massimo) di conservazione. Per il latte ad esempio, hanno previsto 1, 5 e 12 giorni di conservazione. I valori dei tempi e delle temperature di conservazione possono essere elaborati insieme mediante diversi sistemi statistici, tra i quali il sistema Monte Carlo è il più utilizzato. Combinandoli con quelli sui tempi di duplicazione di *L. monocytogenes*, si giunge ad una stima delle variazioni delle cariche di tale microrganismo negli alimenti, nel periodo che intercorre tra la vendita ed il consumo.

La frequenza e la dimensione delle porzioni ingerite possono essere ricavati da stime effettuate nei diversi Paesi relativamente ai consumi alimentari. Ad esempio, per il calcolo della frequenza di consumo di latte e gelato, nella VQR di FDA/USDA sono stati utilizzati i dati forniti dal *Canadian Federal-Provincial Nutrition Survey* (CFPNS, 1992-1995), che ha raccolto le informazioni circa il consumo giornaliero da parte di 10.162 persone, di età compresa tra i 18 ed i 74 anni. Per il latte la contaminazione è risultata pari a $1,0 \log_{10}$ ufc/porzione per il 5° percentile, a $2,5 \log_{10}$ ufc/porzione per il 50° percentile ed a $4,8 \log_{10}$ ufc/porzione per il 95° percentile.

Tra il 2001 ed il 2004 l'*Agence française de sécurité sanitaire des aliments*

(AFSSA, 2006) ha condotto uno studio di valutazione dell'esposizione per alcuni prodotti alimentari francesi di tipo industriale; per quanto riguarda la *rillette*, una preparazione di carne simile al patè, la probabilità di contrarre listeriosi con il consumo di una porzione è risultata uguale a 10^{-8} per gli immunocompetenti e 10^{-6} per gli immunodepressi.

CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO

I dati ottenuti dalla valutazione dell'esposizione e dalle relazioni dose-risposta, vengono combinati per giungere a calcolare la probabilità di contrarre listeriosi.

Nella VQR di FDA/USDA (2003) i risultati vengono descritti in termini di rischio stimato a porzione per il singolo consumatore ed il rischio per anno per varie categorie di consumatori. I dati di ciascuna categoria di alimenti ed il modello dose-risposta vengono utilizzati per stimare il numero di casi per porzione e per anno per ciascuna categoria di alimento (Tab. I).

Per il latte ad esempio, il rischio per porzione è risultato basso ($5,0 \times 10^{-9}$ casi per porzione), ma la frequenza di consumo è alta e contribuisce ad innalzare il numero totale di casi stimati. Al contrario, per il pesce affumicato il rischio per porzione è stato stimato alto ($2,1 \times 10^{-8}$ casi per porzione), ma il consumo di questo tipo di prodotto è modesto (da 1 a 18 porzioni per anno) e quindi il numero totale di casi di listeriosi è stato stimato moderato.

Nel 2005 l'AFSSA ha pubblicato un documento in cui viene proposta una classificazione degli alimenti in base al rischio da *L.monocytogenes*. Secondo questo rapporto ci sarebbero 3 categorie di alimenti: alla prima appartengono tutti quelli che necessitano di un trattamento termico o comunque di un altro tipo di risanamento prima del consumo, per abbattere la contaminazione microbica (ad esempio carne macinata, salsiccia fresca); alla seconda invece fanno capo tutti gli alimenti che presentano caratteristiche tali da non permettere lo sviluppo di *L. monocytogenes* (pH <4,2-4,5; aw < 0,92-0,93; conservazione a temperature di congelamento) oppure per i quali esistono dati pubblicati che ne testimoniano l' inadeguatezza alla crescita di tale microrganismo; al terzo alimenti pronti al consumo per i quali devono essere rispettati tutta una serie di accorgimenti (buone pratiche di lavorazione, rispetto dei tempi di conservazione, informazioni adeguate per il consumatore) finalizzati al controllo di *L. monocytogenes*.

Più recentemente è stata proposta, ai fini di un corretto *risk management*, una classificazione del rischio da *L. monocytogenes* in diversi alimenti, basata sui casi stimati di listeriosi associati al loro consumo (Wells, 2006). Secondo questa classificazione, stilata negli Stati Uniti, ci sarebbe un gruppo di alimenti (*deli meats*, *frankfurters*) per i quali il rischio è notevolmente alto (1 caso di listeriosi ogni 10^7 porzioni). Si tratta di prodotti conservati per lungo tempo, aventi alte percentuali di consumo, nei quali è stata spesso riscontrata la contaminazione da *L. monocytogenes* ed è possibile lo sviluppo rapido di tale microrganismo. A rischio alto sono invece altri prodotti (patè, prodotti ittici affumicati e latte non pastorizzato) che, pur rappresentando un substrato favorevole al suo sviluppo, presentano percentuali moderate od alte di

contaminazione da listeria ed hanno minori tassi di consumo. Il gruppo degli alimenti a rischio moderato comprende i prodotti carnei fermentati freschi e tipo *frankfurters*, sottoposti a ricottura prima del consumo, per i quali è prevista una fase o un trattamento ad effetto battericida o batteriostatico, durante la preparazione o la lavorazione, che riduce il rischio che *L. monocytogenes* si sviluppi fino ad alte cariche. In essi quindi la presenza di tale microrganismo è legata ad una successiva ricontaminazione. Vengono considerati a rischio basso i prodotti ittici, sia freschi che lavorati, che presentano barriere naturali alla crescita di *L. monocytogenes* (flora competitiva, bassi valori di *water activity*), sono poco frequentemente contaminati ed hanno basse percentuali di consumo. Infine c'è il gruppo degli alimenti a rischio molto basso (1 caso di listeriosi ogni 10¹⁴ porzioni) costituito da prodotti lattiero-caseari (latte fermentati, formaggi stagionati e gelato) che non supportano lo sviluppo di listeria a causa di vari fattori limitanti (ad esempio bassi valori di *water activity*, basse temperature di conservazione).

Tab. I. Stime del rischio medio di casi di listeriosi/10 milioni di persone/anno e rischio a porzione per i quattro alimenti RTE considerati. *The mean risk estimates of the number of illness per 10 million people per year and the risk per serving for four RTE foods* (da FDA/USDA, 2003).

Alimento <i>Food</i>	Casi di listeriosi per 10 milioni di persone/anno <i>Cases of listeriosis per 10 million people per year</i>	Casi di listeriosi per 1 milione di porzioni <i>Cases of listeriosis per 1 million servings</i>
Latte <i>Milk</i>	9,1	0,005
Gelato <i>Ice cream</i>	0,012	0,000014
Pesce affumicato <i>Smoked fish</i>	0,46	0,021
Prodotti carnei fermentati <i>Fermented meat</i>	0,00066	0,0000025

CONSIDERAZIONI

La VQR da *L. monocytogenes* in alimenti RTE è stata realizzata da FDA/USDA (2003) allo scopo di rispondere a tre domande ben precise, poste dalla 33^o Sessione del CCFH. La prima è riferita alla stima del rischio di contrarre listeriosi grave consumando alimenti contenenti cariche di *L. monocytogenes* comprese in un range tra assenza in 25 grammi e 1000 ufc/g, e che non superino tali livelli al momento del consumo. Per rispondere a questa domanda sono stati utilizzati due diversi tipi di approccio: - stimare il rischio a porzione ed il numero annuo di casi di listeriosi

prendendo in considerazione la situazione più sfavorevole e cioè che tutte le porzioni di alimento contengano il livello massimo di listeria (0,04, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ufc/g) (Tab. II); - in modo più realistico, ma molto più complesso, utilizzare una distribuzione dei livelli di contaminazione da *L. monocytogenes* negli alimenti al momento del consumo (Tab. III).

Tab. II. Probabilità di contrarre listeriosi per porzione di alimento in categorie sensibili di popolazione, stimata prendendo in considerazione diversi livelli di contaminazione da *L. monocytogenes* al momento del consumo e stima del numero di casi per anno negli USA con RTE contaminati al livello più alto. *Probability of illness per serving for the susceptible population estimated for different levels of L. monocytogenes at the time of consumption and the estimated number of cases per year in the USA if all RTE meals were contaminated at that level* (da FDA/USDA., 2003).

Livello di contaminazione (ufc/g) <i>Level (cfu/g)</i>	Dose ⁽¹⁾ (ufc/g) <i>Dose⁽¹⁾ (cfu/g)</i>	Dose in log ₁₀ (ufc/g) <i>Log₁₀ dose (cfu/g)</i>	Probabilità di malattia per porzione <i>Probability of illness per serving</i>	Rischio relativo ⁽²⁾ <i>Relative risk⁽²⁾</i>	Numero di casi stimati per anno ⁽³⁾ <i>Estimated number of cases per year⁽³⁾</i>
<0,04	1	0	7,39x10 ⁻¹²	1	0,54
0,1	3	0,5	1,85x10 ⁻¹¹	2,5	1
1	32	1,5	1,85x10 ⁻¹⁰	25	12
10	316	2,5	1,85x10 ⁻⁹	250	118
100	3160	3,5	1,85x10 ⁻⁸	2500	1185
1000	31600	4,5	1,85x10 ⁻⁷	25.000	11850

Note: (1) Dimensione delle porzioni di 31,6 g (2) Usando come riferimento il rischio da una dose pari a 1 ufc (3) Considerando un totale di 6,41x10¹⁰ porzioni /anno. *Note: (1) Serving size of 31.6 g. (2) Using the risk from a dose of 1 cfu as reference. (3) A total of 6.41 × 10¹⁰ servings per year assumed.*

Confrontando quanto emerge dai due diversi approcci, si può notare che esiste una notevole differenza tra il numero di casi stimato prendendo in considerazione gli scenari più sfavorevoli, e quello rilevato utilizzando la frequenza ed il livello di contaminazione riscontrato negli alimenti RTE. Comunque in entrambi, quando la frequenza o il livello di contaminazione aumentano, il rischio ed il numero stimato di casi di listeriosi si incrementano anch'essi. Se tutti gli alimenti RTE presentassero una contaminazione compresa tra 1 ufc/g/porzione e 1000 ufc/g/porzione, il rischio di listeriosi aumenterebbe quindi di mille volte. Al contrario, l'introduzione di 10.000 porzioni contaminate con 1000 ufc/g di *L. monocytogenes*, sarebbe compensata,

in teoria, togliendone una con un livello di contaminazione pari a 10^7 ufc/g. Nell'interpretare questi risultati si deve tenere in considerazione che esistono limiti di *L. monocytogenes*, stabiliti dalle normative dei vari Paesi per giudicare la non-conformità di un alimento. Basandosi sui dati raccolti negli Stati Uniti, dove il limite stabilito per *L. monocytogenes* negli alimenti è di 0,04 ufc/g, il numero di casi stimati di listeriosi nella popolazione è di 2130. Se tale limite venisse strettamente rispettato, ci si potrebbe aspettare di avere meno di 1 caso di listeriosi per anno. Ciò suggerisce che in realtà, gli alimenti RTE presentano listerie a valori più alti del limite previsto dalla legge e che l'impatto di tale patologia sulla salute pubblica è da collegare proprio a quegli alimenti che eccedono tali limiti.

Tab. III. Distribuzione dei livelli stimati di contaminazione da *L. monocytogenes* negli alimenti RTE. *Predicted distribution of levels of L. monocytogenes occurring in RTE foods.* (da FDA/USDA 2003).

Livello di contaminazione in ogni alimento al momento del consumo (ufc/g) <i>Level of L. monocytogenes in a food at consumption (cfu/g)</i>	Numero di porzioni assunte alla dose specifica ³⁾ <i>Number of servings assumed at the specified dose</i>
<0,04	$6,18 \times 10^{10}$
0,1	$1,22 \times 10^9$
1	$5,84 \times 10^8$
10	$2,78 \times 10^8$
100	$1,32 \times 10^8$
1000	$6,23 \times 10^7$
10.000	$2,94 \times 10^7$
100.000	$1,39 \times 10^7$
316.000	$3,88 \times 10^6$
> 1.000.000	$8,55 \times 10^6$
Totale <i>Total</i>	$6,41 \times 10^{10}$

Di conseguenza, fissare un limite meno rigoroso per gli alimenti RTE potrebbe essere favorevole, in termini di salute pubblica, se allo stesso tempo si procedesse ad una più efficace applicazione delle misure di controllo, al fine di diminuire sostanzialmente il numero di porzioni che eccedono grandemente questo limite.

Per approfondire questo concetto è stato sviluppato uno scenario ipotetico in cui viene descritto l'impatto sulla salute pubblica di due diversi limiti di conformità ai criteri microbiologici stabiliti per legge, 0,04 ufc/g e 100 ufc/g e prendendo in

considerazione diversi tassi di non conformità, che rappresentano la percentuale di porzioni di alimento che eccedono tali limiti. Per semplificare il modello è stato assunto per tutte le porzioni non conformi un singolo livello di *L. monocytogenes* pari a 10^6 ufc/g, in modo tale da focalizzare l'attenzione sul gruppo di alimenti che sono responsabili della maggior parte dei casi di listeriosi. I risultati di questo modello statistico evidenziano che con il 100% di conformità, il numero stimato di casi è basso per tutti e due i limiti. Come è prevedibile, il numero di casi aumenta con il crescere della frequenza degli alimenti non conformi. Sarebbe possibile un miglioramento della situazione dal punto di vista della salute pubblica, se l'aumento dei limiti previsti negli alimenti RTE fosse quindi accompagnato ad una sostanziale diminuzione del numero di porzioni di alimento che eccedono il limite stabilito, quindi se aumentasse il tasso di conformità.

Riassumendo, si può affermare che la valutazione del rischio dimostra che gran parte dei casi di listeriosi è conseguente al consumo di alimenti con alte cariche di *L. monocytogenes*, che quindi non sono conformi ai limiti previsti dalla legge. L'ingestione con l'alimento di un basso numero di listerie ha poche probabilità di causare malattia. È con l'eliminazione di alti livelli di contaminazione al momento del consumo, che si ottiene un impatto favorevole sulla salute pubblica.

La seconda domanda posta dal CCFH riguarda la stima del rischio di listeriosi grave nei consumatori appartenenti alle categorie più sensibili (anziani, neonati, donne in gravidanza, pazienti immunocompromessi), in confronto a quello dei consumatori in buono stato di salute.

I risultati della VQR mostrano che la probabilità di ammalarsi dopo l'ingestione di alimenti contaminati da *L. monocytogenes*, è molto più alta nelle categorie più sensibili rispetto al resto dei consumatori e varia nei diversi gruppi presi in considerazione. Basandosi su dati disponibili, relativi alla situazione negli Stati Uniti, è stato stimato che gli anziani (di 60 anni ed oltre) sono 2,6 volte più sensibili rispetto ai consumatori in buono stato di salute, mentre i neonati sono 14 volte più sensibili.

La terza domanda posta dal CCFH è relativa al rischio di contrarre la forma più grave di listeriosi consumando alimenti che supportano la crescita di *L. monocytogenes* ed alimenti che invece non ne permettono lo sviluppo in condizioni specifiche di conservazione.

Per rispondere a tale quesito, la VQR di FDA/USDA prevede tre diversi approcci:

- una considerazione generale dell'impatto della dose ingerita sul rischio listeriosi;
- un confronto dei quattro alimenti presi in esame (in base alle differenze di prevalenza e livello di contaminazione, composizione e quantità consumate) per valutare l'effetto dello sviluppo o del mancato sviluppo di *L. monocytogenes* sul rischio;
- una simulazione di scenari ipotetici per valutare gli alimenti nei quali *L. monocytogenes* può svilupparsi.

Come già detto tale microrganismo può sviluppare in molti alimenti RTE, anche in condizioni appropriate di conservazione, alle temperature di refrigerazione. Sono molti i fattori che ne influenzano la crescita: la composizione dell'alimento, il tempo e la temperatura di conservazione, le interazioni con la microflora antagonista. Nella Tab. IV vengono illustrati i diversi tempi di duplicazione di listeria nei differenti alimenti ed in funzione del tipo e della temperatura di conservazione. *L. monocytogenes* può

sviluppare a temperature prossime a 0°C, con *water activity* di 0,91-0,93 e pH 4,2. La combinazione di più valori sub-ottimali dei vari parametri ne riduce il tempo di duplicazione e può prevenirne o limitarne lo sviluppo in modo efficace; questo concetto, sul quale si basa la cosiddetta *hurdle technology*, viene infatti applicato nei processi di trasformazione degli alimenti RTE, proprio per prevenire o limitare la moltiplicazione di *L. monocytogenes*.

I risultati della VQR mostrano che la possibilità di sviluppo di tale microrganismo in un substrato alimentare influenza notevolmente il rischio ed è fortemente condizionata dalle condizioni e dalla durata della conservazione a temperatura di refrigerazione dell'alimento. Utilizzando i quattro alimenti selezionati, la loro capacità di supportare lo sviluppo di *L. monocytogenes* aumenta il rischio di listeriosi di 100-1000 volte/porzione.

Tab. IV. Tempi di duplicazione (ore) e crescita potenziale di *L. monocytogenes* a differenti temperature e shelf-life a 5°C in diversi alimenti RTE. *Representative generation times (hours) and growth of L. monocytogenes at different temperatures and shelf lives at 5°C in various RTE foods* (da Buchanan et al., 2004).

Temperatura (C°) Temperature (C°)	Tempo di duplicazione <i>Generation time</i>			
	Latte <i>Milk</i>	Pesce affumicato sotto-vuoto <i>Vacuum-packed cold-smoked fish</i>	Prodotti di carne sottovuoto <i>Vacuum-packed processed meat</i>	Verdure già tagliate <i>Sliced vegetables</i>
5 (intervallo di confidenza: 95%) (95% confidence interval)	27,6 (14- 226)	46,6 (20-∞)	29,6 (14-∞)	111 (28-∞)
5	25-30	40-49	16-48	-
10	5-7	8-11	7-10	-
25	0,7-1	1,2-1,7	1-1,6	-
5	Potenziale di crescita * <i>Growth potential*</i>			
	~ 2-3	~ 4-5	~ 8-9	~ 0,3
	Shelf-life raccomandata <i>Advisory shelf-life (weeks)</i>			
5	1-2	4-6	6-8	1
Nota: * Crescita logaritmica senza considerare la lag phase o l'effetto antagonista dei batteri lattici. <i>Note: * Log increase ignoring lag phase or suppression of growth by lactic acid bacteria.</i>				

Secondo gli Autori della valutazione del rischio tutte le misure di controllo attuate allo scopo di ridurre la frequenza ed i livelli di contaminazione hanno quindi un impatto favorevole sulla riduzione dei casi di listeriosi, così come il controllo dello sviluppo di *L. monocytogenes* successivo alla trasformazione.

CONCLUSIONI

Dalla VQR di *L. monocytogenes* in alimenti *ready-to-eat* ed in particolare dai risultati del lavoro realizzato da FDA/USDA (2003), emerge quanto segue:

- La probabilità di contrarre listeriosi consumando alimenti contaminati da *L. monocytogenes* è influenzata da tre fattori principali e cioè la matrice alimentare, la virulenza del ceppo e la sensibilità del consumatore.
- I modelli predittivi sviluppati evidenziano che quasi tutti i casi di listeriosi sono conseguenti ad alimenti con elevati livelli di contaminazione.
- Il rischio di contrarre listeriosi con gli alimenti non sembra essere diverso da un Paese ad un altro. Ciò nonostante le differenze nella lavorazione e nella manipolazione degli alimenti possono influenzare il livello di contaminazione e quindi anche il rischio a porzione per un determinato alimento. L'impatto sulla salute pubblica di ciascun alimento può essere valutato sia attraverso il rischio a porzione, sia attraverso il numero di casi per ciascuna popolazione l'anno.
- Le misure di controllo attuate per ridurre la frequenza della contaminazione dovrebbero portare ad una proporzionale riduzione dei casi di malattia, sempre che la percentuale di alti livelli di contaminazione al consumo si riduca parallelamente. Le misure di controllo attuate per prevenire gli alti livelli di contaminazione dovrebbero avere quindi un forte impatto sulla riduzione dei tassi di listeriosi.
- Nonostante gli alti livelli di contaminazione siano relativamente rari, un miglioramento della situazione dal punto di vista della salute pubblica potrebbe derivare dall'applicazione di tecniche di lavorazione e conservazione che non permettono a *L. monocytogenes* di sviluppare.
- La maggior parte dei casi di listeriosi è associata al consumo di alimenti che non rispettano i limiti previsti per *L. monocytogenes*, sia nel caso in cui sia prevista la tolleranza zero, sia quando il limite sia pari a 100 ufc/g.

Tali risultati devono peraltro essere interpretati tenendo conto che in questa VQR sono stati considerati solo quattro alimenti RTE ed è stato preso in esame solo il periodo dalla vendita al dettaglio al consumo. Inoltre la maggior parte dei dati utilizzati, risalenti ad un periodo anteriore al 2002, è ristretta ad alimenti reperibili negli Stati Uniti ed anche le informazioni relative al consumo si riferiscono essenzialmente a quanto osservato negli Stati Uniti ed in Canada.

Quanto emerge dalla VQR di FDA/USDA (2003) era già in parte noto, ma ha trovato, con il lavoro di questi Ricercatori, un'autorevole conferma, supportata dalla raccolta e dall'elaborazione statistica di tutti i dati disponibili. Questo documento ha permesso inoltre di dare una risposta precisa ad alcune tra le più importanti questioni riguardanti *L. monocytogenes* negli alimenti RTE, fornendo un modello che permette di valutare diverse opzioni potenziali per la gestione del rischio.

Il documento di VQR di FDA/USDA (2003) può costituire la base per nuovi modelli di studio su *L. monocytogenes* ed alimenti RTE, come dimostra il *risk ranking* effettuato recentemente da Wells (2006), avente lo scopo di proporre soluzioni per la gestione del rischio da listeria nelle carni.

Infine, si deve sottolineare che anche l'identificazione delle lacune e delle

incertezze presenti in questo tipo di lavori, si rivela estremamente utile, poiché permette di focalizzare l'attenzione del mondo scientifico sulle priorità future della ricerca in questo campo.

BIBLIOGRAFIA

- AFSSA - AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS (2006). Construction d'une démarche interdisciplinaire de description du processus sanitaire modulant l'exposition au danger *L. monocytogenes* dans les produits réfrigérés. Rapport de recherche. www.afssa.fr.
- AURELI P., FIORUCCI G.C., CAROLI D., MARCHIARO B., NOVARA O., LEONE L., SALMOSO S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.*, 342: 1236-1241.
- BAUDA P., MONFORT P. (2004). Agents pathogènes et modifications des environnements: quels risques actuels et futurs ? *Environnement, risques et santé*, 3: 165-172.
- BILLE J. (1990). Epidemiology of listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak, pp. 71-74, in: Miller A.L., Smith J.L. Somkuti G.A.: *Foodborne Listeriosis*. Elsevier Science Pub. New York.
- BROOME C.V., GELLIN B., SCHWARTZ B. (1990). Epidemiology of listeriosis in the United States, pp. 61-65, in: Miller A.L., Smith J.L. and Somkuti G.A.: *Foodborne Listeriosis*. Elsevier Science Pub. New York.
- BUCHANAN R.L., STAHL H.G., BENCIVENGO M.M., DEL CORRAL R. (1989). Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactain and modified Vogel Johnson agars for detection of *Listeria* species in retail-level meats, poultry and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 599-603.
- CDC (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) (2006). Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 sites, United States. www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwr.html.
- CFPNS (CANADIAN FEDERAL-PROVINCIAL NUTRITION SURVEYS) (1992-1995). Bureau of Biostatistics and Computer Applications, Food Directorate, Health Canada.
- DALTON, C.B., AUSTIN, C.C., SOBEL, J., HAYES, P.S., BIBB, W.F., GRAVES, L.M. & SWAMINATHAN, B. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.*, 336: 100-105.
- DEVALKH., JACQUET C., GOULET V., VAILLANT V., PERRAA:, SIMON F., DESENCLOS J.C. (2005). Surveillance of listeria infections in Europe. *Euro Surveill.*, 10(10): 251-255.
- DOGANAY M. (2003). Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35: 173-175.
- FARBER J.M., PETERKIN P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*: A food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55: 476-511.
- FARBER J.M., ROSS W.H. HARWIG J. (1996). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int. J. Food Microbiol.*, 30: 145-156.
- FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) (2001). Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture/Centers for Disease Control and Prevention, Washington DC.
- FDA/USDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION/USDA FOOD SAFETY AND INSPECTION AGENCY) (2003). Quantitative assessment of the relative risk to public

- health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Report published by Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDA) and Food Safety Inspection Service (USDA). www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html.
- FERRI M., GIACCONE V. (2003). Il sistema Monte Carlo e la valutazione quantitativa del rischio microbiologico nell'igiene degli alimenti. Il Progresso Veterinario, 58. www.ilprogressoveterinario.it/rivista/03n05/spec.02.
- HOF H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 35: 199-202.
- HOF H., ROCOURT J. (1992). Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk? Int. J. Food Microbiol., 16: 173-182.
- IVANEK R., GROHN Y.T., WIEDMANN M. (2006). *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. Foodborne Pathog. Dis., 3: 319-336.
- MC LAUHLIN J. (1990). Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 9: 210-213.
- MEAD P.S., SLUTSKER L., DIETZ V., MCCRAIG L.F., BRESEE S., SHAPIRO C., GRIFFIN P.M., TAUXE R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis., 5: 607-625.
- NAUTA M.J. (2001). A modular process risk model structure for quantitative microbiological risk assessment and its application in an exposure assessment of *Bacillus cereus* in a REPFED. RIVM report 149106007. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands. www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/149106007.html
- NOTERMANS S., DUFRENNE J., TEUNIS P., CHACKRABORTY T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 61: 244-248.
- PINNER R.W., SCHUCHATA A., SWAMINATHAN B., HAYES P.S., DEEVER K.A., WEAVER R.E., PLIKAYTIS B.D. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. J. Am. Med. Ass., 267: 2046-2050.
- Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare. GUCE n. L 31 del 1/2/2002.
- Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari. GUCE n. L 139/1 del 30/4/2004.
- Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. GUCE n. L 139/1 del 30/4/2004.
- Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. GUCE n. L 139/1 del 30/4/2004.
- Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. GUCE n. L 139/1 del 30/4/2004.
- ROCOURT J. (1996). Risk factors for listeriosis. Food Control, 7: 192-202.
- ROCOURT J., COSSART P. (1997). *Listeria monocytogenes*. pp. 337-352, in: M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. American Society of Microbiology. Washington, DC.
- RYSER E.T., MARTH E.H. (1991). Listeria, Listeriosis, and Food Safety. New York NY: Marcel Dekker.
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. (1999). Listeria, Listeriosis, and Food Safety. 2nd edition, revised

- and expanded. New York NY: Marcel Dekker.
- SKIDMORE A.G. (1981). Listeriosis at Vancouver general hospital, 1965-79. *Can. Med. Assoc. J.*, 125: 1217-1221.
- WELLS I. (2006). Role of quantitative risk assessment and food objectives in managing *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Meat Science*, 74: 66-75.

